



19 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

22 Offenlegungsschrift  
10 DE 102 06 325 A 1

51 Int. Cl. 7:  
C 12 N 1/20

21 Aktenzeichen: 102 06 325.7  
22 Anmeldetag: 14. 2. 2002  
43 Offenlegungstag: 4. 9. 2003

DE 102 06 325 A 1

71 Anmelder:  
MedInnova Gesellschaft für medizinische  
Innovationen aus akademischer Forschung mbH,  
35037 Marburg, DE

74 Vertreter:  
Albrecht, Lücke & Jungblut Patentanwälte, 14195  
Berlin

72 Erfinder:  
Goebel, Werner, 97218 Gerbrunn, DE; Rapp, Ulf R.,  
97078 Würzburg, DE; Sedlacek, Hans-Harald, 35041  
Marburg, DE; Fensterle, Joachim, 97078 Würzburg,  
DE; Gentschev, Ivaylo, 97270 Kist, DE

56 Entgegenhaltungen:  
WO 98 50 067 A2  
HERRERO, M., LORENZO, V., TIMMIS, K.N.:  
Transposon  
vectors containing non-antibiotic resistance  
selection markers for cloning and stable chromo-  
somal insertion of foreign genes in gram-negative  
bacteria. 1990. In: J. Bacteriol., Vol. 172,  
S. 6557, PubMed-Abstr.: 2172216;

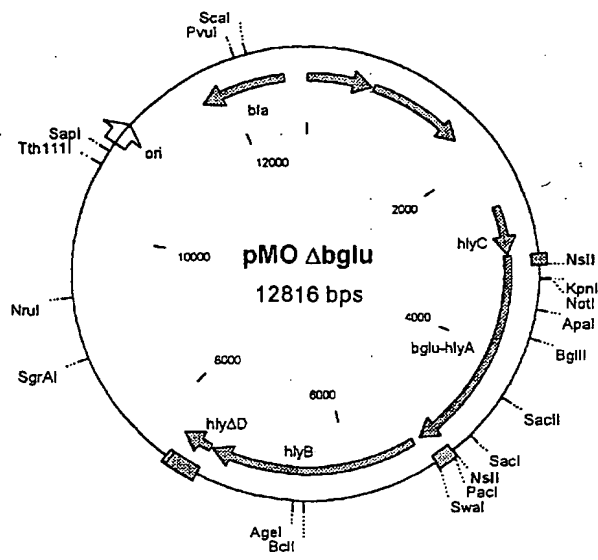
BEST AVAILABLE COPY

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

54 Ummantelter Mikroorganismus

57 Die Erfindung lehrt einen ummantelten Mikroorganis-  
mus, in dessen Genom folgende Komponenten eingefügt  
und exprimierbar sind: I) eine Nukleotidsequenz, kodie-  
rend für ein direkt oder indirekt, antiproliferativ oder zyto-  
toxisch wirkendes Expressionsprodukt oder für mehrere  
verschiedene solcher Expressionsprodukte, II) eine Nukle-  
otidsequenz, welche für ein Blutplasmaprotein unter  
der Kontrolle einer im Mikroorganismus aktivierbaren Ak-  
tivierungssequenz kodiert oder konstruktiv aktiv ist, III)  
optional, eine Nukleotidsequenz, welche für einen zell-  
spezifischen Liganden unter der Kontrolle einer im Mi-  
kroorganismus aktivierbaren Aktivierungssequenz kodi-  
ert oder konstruktiv aktiv ist, IV) eine Nukleotidsequenz  
für ein Transportsystem, welches die Expression der Ex-  
pressionsprodukte der Komponenten I) und II) sowie op-  
tional III) auf der Außenfläche des Mikroorganismus oder  
die Sekretion der Expressionsprodukte der Komponente  
I) und Expression der Komponente II) sowie optional III)  
bewirkt und vorzugsweise konstitutiv aktiv ist, V) optional  
eine Nukleotidsequenz für ein Protein zur Lyse des Mi-  
kroorganismus im Cytosol von Säurezellen und zur intra-  
zellulären Freisetzung von Plasmiden mit zumindest einer  
oder mehreren der Komponenten I) und VI) enthalten  
in dem lysierten Mikroorganismus, und VI) eine in dem Mi-  
kroorganismus aktivierbare, und/oder eine gewebezell-  
spezifische, tumorzellspezifische, funktionsspezifische  
oder nicht zellspezifische Aktivierungssequenz zur Ex-  
pression von ...



DE 102 06 325 A 1

## Beschreibung

## Gebiet der Erfindung

- 5 [0001] Die Erfindung betrifft einen Mikroorganismus mit fremden Nukleotidsequenzen, mittels welcher antiproliferativ oder zytotoxisch wirkende Expressionsprodukte exprimierbar sind, sowie die Verwendung solcher Mikroorganismen zur Herstellung pharmazeutischer Zusammensetzungen, ein Plasmid sowie ein Verfahren zur Herstellung eines solchen Mikroorganismus, sowie Verwendungen solcher Mikroorganismen.

## 10 Hintergrund der Erfindung und Stand der Technik

- [0002] In Ihrer Virulenz reduzierte Mikroorganismen wie beispielsweise genetisch modifizierte Viren oder in ihrer Virulenz attenuierte Bakterien gewinnen als Träger von fremden Nukleinsäuresequenzen im Rahmen der Gentherapie zunehmend an Bedeutung.
- 15 [0003] Zur Gentherapie werden die fremden Nukleinsäuren entweder in vitro in Gewebezellen eingeführt und diese Zellen dem Patienten verabreicht, oder die Mikroorganismen werden dem Patienten injiziert in der Erwartung, dass die Mikroorganismen als Genfähren die fremde Nukleinsäure in die gewünschte Gewebezelle übertragen.
- [0004] Mikroorganismen stellen Partikel dar. Nach Injektion in einen Organismus werden diese Partikel vorwiegend durch das sogenannte retikuloendotheliale System aufgenommen. Um entgegen diesem Eliminationsmechanismus dennoch eine Anreicherung der als Genfähren benutzten Mikroorganismen in einem Zielgewebe zu erreichen, wurden die
- 20 [0005] Mikroorganismen mit zellspezifischen Liganden ausgestattet. Bislang konnte trotz dieser Ausstattung die Elimination der Mikroorganismen durch das retikuloendotheliale System nur geringfügig vermindert werden.
- [0005] Ein wesentliches Forschungsziel der Gentherapie ist die Therapie proliferativer Erkrankungen, – wie beispielsweise von Tumoren, Leukämien, chronische Entzündungen, Autoimmunerkrankungen und Abstoßungen von transplantierten Organen –, deren Behandlung trotz aller Erfolge der Arzneimitteltherapie immer noch unzureichend ist.
- 25 [0006] Beispielsweise konnte trotz aller Erfolge der Chirurgie, der Radiotherapie, der Chemotherapie und auch der Immuntherapie bei der Behandlung von Tumoren bislang keine Heilung von fortgeschrittenen Tumoren des Kopfes und des Halses, des Zentralen Nervensystems, der Brustdrüse, der Lunge, des Magen-Darm-Traktes, der Leber, der Bauchspeicheldrüse, der Niere, der Haut, der Ovarien und der Prostata erzielt werden.
- 30 [0007] Die Gründe für diesen mangelhaften Erfolg der Tumorthherapie sind vielgestaltig und noch nicht umfassend bekannt. Zu den wesentlichen Gründen gehören jedoch i) vorab (primär) bestehende Resistenzen der Tumorzellen gegen die in vivo erreichbaren Konzentrationen von Chemotherapeutika, von Bestrahlungen oder gegen Immuntherapeutika, ii) in Reaktion auf die Therapie entstehende Resistenzen gegen das jeweilige Therapeutikum. Diese induzierten, sogenannten sekundären Resistenzen haben ihre Ursache in der genetischen Variabilität der Tumorzellen, die es ihnen ermöglicht, den Einwirkungen der Tumortherapeutika durch die Entwicklung von Resistenzmechanismen auszuweichen, iii) in pharmakokinetischen und/oder pharmakodynamischen Unzulänglichkeiten der bislang verfügbaren Tumortherapeutika, auf Grund derer die Konzentration des jeweiligen Tumortherapeutikums am Ort des Tumors, gleichgültig ob es sich um Primärtumore, Rezidive oder Metastasen handelt, absolut zu gering ist, um den Tumor zu eliminieren. Zu diesen Unzulänglichkeiten der Tumortherapeutika gehören, iv) ein zu hohes Verteilungsvolumen, v) die mangelhafte Anreicherung am
- 35 Tumor bzw. an den Tumorzellen, vi) die mangelhafte Penetrationsfähigkeit im Tumor und/oder vii) die toxische Wirkung auf den Gesamtorganismus, welche eine Erhöhung der Dosis für eine erhöhte Anreicherung am Tumor einschränkt.
- 40 [0008] In der Vergangenheit wurde mit unterschiedlichen Verfahren versucht, Tumortherapeutika am Tumor anzureichern.
- [0009] Tumorzellspezifische Liganden, beispielsweise Antikörper oder deren Spaltprodukte, gekoppelt an Zytostatika, an antitumoral wirkende Cytokine, an zytotoxische Proteine, oder an Isotopen führten zwar zu einer Anreicherung der zytotoxischen Wirksubstanzen am Tumor im Vergleich zum Normalgewebe, jedoch war diese Anreicherung in den weit-
- 45 aus meisten Fällen nicht ausreichend für eine Therapie des Tumors (Übersicht: Sedlacek et al., Contributions to Oncology 43: 1–145, 1992; Carter, Nature Reviews Cancer 1: 118–129, 2001).
- [0010] In Konsequenz wurden Amplifikationssysteme entworfen, mit Hilfe derer die Konzentration des jeweiligen Wirkstoffes am Tumor erhöht werden konnte.
- 50 [0011] Ein Amplifikationssystem hatte zum Ziel, in dem Tumor solche Enzyme einzubringen, welche im restlichen Körper nicht allgemein zugänglich oder fremd waren und die wiederum im Tumor eine untoxische Vorstufe eines Zytostatikums in das zytotoxisch aktive Zytostatikum umwandeln oder spalten konnten. Das Einbringen der Enzyme in den Tumor erfolgte entweder durch die Verabreichung von tumorzellspezifischen Liganden, gekoppelt an diesen Enzymen (beispielsweise in Form der Antibody-Derived Enzymemediated Prodrug-Therapy; ADEPT) oder durch die Verabreichung von Genen für diese Enzyme mit Hilfe von tumorzellspezifischen oder nicht spezifischen Vektoren (Gene Derived Enzym-mediated Prodrug Therapy; GDEPT) (Sedlacek et al., Contributions to Oncology 43: 1–145, 1992; Sedlacek, Critical Reviews in Oncology/Hematology 37: 169–215, 2001; McCormick Nature Reviews Cancer 1: 130–141, 2001; Carter, Nature Reviews Cancer 1: 18–129, 2001).
- 60 [0012] Die bisherigen klinischen Untersuchungen mit ADEPT oder GDEPT haben jedoch unzureichende therapeutische Ergebnisse erbracht. Als wesentliche Probleme erwiesen sich i) die Immunogenität eines körperfremden Enzymes, ii) die relativ geringe Tumor-Lokalisationsrate eines Antikörper-Enzym-Konjugates (ADEPT), iii) die technischen Schwierigkeiten, Fusionsproteine aus einem humanisierten Antikörper mit einem humanem Enzym in ausreichend großer Menge zu tragbaren Kosten herzustellen, iv) die mangelnde Tumor-Penetration der Antikörper-Enzym-Konjugate oder der Gen-Vektoren und v) die zu geringe Transduktionsrate in vivo, d. h., die Anzahl an Tumorzellen eines Tumorknotens, in welchen die Gene für das Enzym exprimiert werden konnten, war zu gering für eine tumor-therapeutische Wirksamkeit.
- 65 [0013] Ein weiteres Amplifikationssystem basiert auf der Induktion einer Immunreaktion gegen Tumorzellen, im Zuge

derer spezifische Antikörper-bildende Zellen und zytotoxische Zellen proliferieren. Zur Induktion einer Immunreaktion werden Tumorantigene in geeigneter Zubereitung verabreicht. Ziel ist es, die offensichtlich bei Tumorpatienten bestehende Immuntoleranz gegen seinen Tumor und/oder Resistenz seines Tumors gegen seine eigene Immunreaktion zu durchbrechen.

[0014] Innerhalb der letzten Jahrzehnte wurden zahlreiche technische Variationen der Tumorstimmung durch Kombination von verschiedenen Tumorantigenen mit Adjuvantien klinisch geprüft, jedoch ohne den erhofften Durchbruch in der Tumorthherapie zu bringen. Zwar haben neue Ansätze, beispielsweise die Verabreichung von Kombinationen von immunogenen tumorspezifischen Antigenen mit neuen Adjuvantien, oder von dendritischen Zellen, beladen mit tumorspezifischen Antigenen, oder von Nukleotidsequenzen, die für tumorspezifische Antigen kodieren, erste hoffnungsvolle klinische Ergebnisse erbracht, jedoch ist bislang auch hier ein Durchbruch in der Tumorthherapie noch nicht erkennbar.

[0015] Eine Technik wurde entwickelt, Expressionsprodukte von in Bakterien eingeführten Nukleinsäuresequenzen auf der Zellmembran dieser Bakterien zu exprimieren oder von diesen Bakterien sekretieren zu lassen. Basis dieser Technik ist das *Escherichia coli* Hämolysinsystems HlyAs, welches den Prototyp eines Typ I Sekretionssystems von gramnegativen Bakterien darstellt. Mit Hilfe des HlyAs wurden Sekretionsvektoren entwickelt, die eine effiziente Ausschleusung von Proteinantigenen in *Salmonella enterica*, *Yersinia enterocolitica* und *Vibrio cholerae* ermöglichen. Derartige Sekretionsvektoren enthalten die cDNA eines beliebigen Proteinantigens gekoppelt an die Nukleotidsequenz für das HlyA-Signalpeptid, für den Hämolysin-Sekretionsapparat, hlyB und hlyD und den hly-spezifischen Promoter. Mit Hilfe dieses Sekretionsvektors kann ein Protein auf der Oberfläche dieses Bakteriums exprimiert werden. Derartig genetisch modifizierte Bakterien induzieren als Vakzinen einen weitaus stärkeren Immunschutz als Bakterien, in welchen das von der eingeführten Nukleinsäure exprimierte Protein zellintern verbleibt (Donner et al EP 1015023 A, Gentschev et al. Gene, 179: 133-140, 1996; Vaccine 19: 2621-2618, 2001, Hess et al PNAS 93: 1458-1463, 1996). Nachteil dieses Systems ist jedoch, dass durch Verwendung des hly-spezifischen Promoters die Menge des auf der Außenfläche des Bakteriums exprimierten Proteins äußerst gering ist.

[0016] Eine Technik zur Einschleusung von Plasmid-DNA in Säugerzellen durch Trägerbakterien wie *Salmonella* und *Listeria monocytogenes* wurde entwickelt. In diesen Plasmiden enthaltene Gene konnten in den Säugerzellen auch dann exprimiert werden, wenn sie unter der Kontrolle eines eukaryontischen Promoters standen. In *Listeria monocytogenes* Keime wurden Plasmide eingeführt, die eine Nukleotidsequenz für ein beliebiges Antigen unter der Kontrolle eines beliebigen eukaryontischen Promoters enthalten. Durch Einführung der Nukleotidsequenzen für ein spezifisches Lysis-Gen wurde bewirkt, dass sich die *Listeria monocytogenes* Keime im Zytosol der Antigen-präsentierenden Zelle auflösen und ihre Plasmide freisetzen, was zur anschließenden Expression, Prozessierung und Präsentation der plasmidkodierten Proteine führt und die Immunogenität dieser Proteine deutlich steigert (Dietrich et al. Nat. Biotechnol 16: 181-185, 1998; Vaccine 19: 2506-2512, 2001).

[0017] Virulenz-attenuierte Varianten von Bakterien, die sich intrazellulär ansiedeln, wurden entwickelt. Beispielsweise wurden von *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* sv. Typhimurium und Typhi, sowie BCG derartige Varianten bereits als gut verträgliche Lebendimpfstoffe gegen Typhus und Tuberkulose eingesetzt. Diese Bakterien, einschließlich ihrer abgeschwächten Mutanten sind generell immunstimulierend und können eine gute zelluläre Immunantwort auslösen. Beispielsweise stimuliert *L. monocytogenes* in besonderem Maße über die Aktivierung von TH1 Zellen die Proliferation von zytotoxischen Lymphozyten. Diese Bakterien liefern sezernierte Antigene direkt in das Cytosol Antigen-präsentierender Zellen (APC; Makrophagen und Dendritische Zellen), die ihrerseits die kostimulierenden Moleküle exprimieren und eine effiziente Stimulierung von T-Zellen auslösen. Die Listerien werden zum Teil in phagosomalen Kompartimenten abgebaut und die von diesen Trägerbakterien produzierten Antigene können daher einerseits über MHC Klasse II Moleküle präsentiert werden und damit zur Induktion von T-Helferzellen führen. Andererseits replizieren die Listerien nach Freisetzung aus dem Phagosom im Cytosol von APCs; von diesen Bakterien produzierte und sezernierte Antigene werden deshalb bevorzugt über den MHC Klasse I-Weg präsentiert, wodurch CTL Antworten gegen diese Antigene induziert werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass durch die Interaktion der Listerien mit Makrophagen, natürlichen Killerzellen (NK) und Neutrophilen Granulozyten die Expression solcher Cytokine (TNF-alpha, IFN-gamma, IL-2, IL-12; Unanue, Curr. Opin. Immunol, 9: 35-43, 1997; Mata and Paterson, J Immunol 163: 1449-14456, 1999) induziert wird, für welche eine antitumorale Wirksamkeit nachgewiesen wurde. So konnte durch die Verabreichung von *L. monocytogenes*, welche transduziert waren zur Expression von Tumorantigenen, antigenspezifisch das Wachstum von experimentellen Tumoren gehemmt werden (Pan et al Nat Med 1: 471-477, 1995, Cancer Res 59: 5264-5269, 1999; Voest et al. Natl Cancer Inst 87: 581-586, 1995; Beatty and Paterson, J Immunol 165: 5502-5508, 2000). Virulenz-attenuierte *Salmonella enterica* Stämme, in welche Nukleotidsequenzen kodierend für Tumorantigene eingeführt worden waren, konnten als Tumorantigen-exprimierende bakterielle Träger nach oraler Verabreichung einen spezifischen Schutz gegen unterschiedliche experimentelle Tumoren bewirken (Medina et al., Eur J Immunol 30: 768-777, 2000, Zoller und Christ J Immunol 166: 3440-3450, 2001; Xiang et al., PNAS 97: 5492-5497, 2000). Rekombinante *Salmonella* Stämme waren auch als prophylaktische Vakzine gegen Virusinfektionen (HPV) Infektionen (Benyacoub et al., Infect Immun 67: 3674-3679, 1999) und zur therapeutischen Behandlung eines durch ein Tumovirus (HPV) immortalisierten Maustumors wirksam (Revaz et al., Virology 279: 354-360, 2001). Für die systemische Tumorthherapie wurden *Salmonella*-Stämme selektioniert, welche spezifisch ausgewählte Tumorgewebe besiedeln (Murray et al J Bacteriol 183: 5554-5564, 2001). In diese *Salmonella*-Stämme wie auch in *Escherichia coli* Stämme wurden Nukleotidsequenzen kodierend für ausgewählte Enzyme eingeführt und diese bakteriellen Träger erfolgreich für GEDPT in vitro wie auch in vivo in experimentellen Tumorsystemen eingesetzt (Pawelek et al Cancer Res 57: 4537-4544, 1997).

[0018] Entzündungsgewebe und besonders Tumorgewebe zeichnen sich durch eine verstärkte, im Tumor meist chaotisch verlaufende Angiogenese aus. In diese neugebildeten Gefäße können sich lösliche wie auch partikuläre Substanzen anreichern, soweit sie über ein niedriges Verteilungsvolumen und damit über eine relativ lange Bluthalbwertszeit verfügen. Diese Anreicherung (auch als passives Targeting bezeichnet), kann für therapeutische Verfahren genutzt werden (Sedlacek, Critical reviews in Oncology/Hematology 37: 169-215, 2001).

- [0019] Der Erfindung liegt das technische Problem zu Grunde, eine pharmazeutische Zusammensetzung anzugeben, welche in der Behandlung proliferativer Erkrankungen, insbesondere in der Tumorthherapie, eine erhöhte Wirksamkeit zeigen.
- [0020] Grundkonzeption der Erfindung sowie der Erfindung zu Grunde liegende Erkenntnisse.
- [0021] Zur Lösung dieses technischen Problems lehrt die Erfindung einen ummantelten Mikroorganismus, in dessen Genom folgende Komponenten eingefügt und exprimierbar sind: I) eine Nukleotidsequenz, kodierend für ein direkt oder indirekt, antiproliferativ oder zytotoxisch wirkendes Expressionsprodukt oder für mehrere verschiedene solcher Expressionsprodukte, II) eine Nukleotidsequenz, welche für ein Blutplasmaprotein unter der Kontrolle einer im Mikroorganismus aktivierbaren Aktivierungssequenz kodiert oder konstitutiv aktiv ist, III) optional, eine Nukleotidsequenz, welche für einen zellspezifischen Liganden unter der Kontrolle einer im Mikroorganismus aktivierbaren Aktivierungssequenz kodiert oder konstitutiv aktiv ist, IV) eine Nukleotidsequenz für ein Transportsystem, welches die Expression der Expressionsprodukte der Komponenten I) und II) sowie optional III) auf der Außenfläche des Mikroorganismus oder die Sekretion der Expressionsprodukte der Komponente I) und Expression der Komponente II) sowie optional III) bewirkt und vorzugsweise konstitutiv aktiv ist, V) optional eine Nukleotidsequenz für ein Protein zur Lyse des Mikroorganismus im Cytosol von Säugerzellen und zur intrazellulären Freisetzung von Plasmiden mit zumindest einer oder mehreren der Komponenten I) und VI) enthalten in dem lysierten Mikroorganismus, und VI) eine in dem Mikroorganismus aktivierbare, und/oder eine gewebezellspezifische, tumorzellspezifische, funktionsspezifische oder nicht zellspezifische Aktivierungssequenz zur Expression von Komponente I), wobei jede der Komponenten I) bis VI) einfach oder mehrfach, jeweils gleich oder verschieden, eingerichtet sein kann.
- [0022] Im Rahmen der Erfindung werden vorzugsweise ummantelte Mikroorganismen als Träger für genetische Informationen und die Verwendung dieser ummantelten Mikroorganismen zur Prophylaxe und Therapie einer proliferativen Erkrankung beschrieben. Hierbei beruht die Erfindung auf folgenden Erfahrungen und technischen Entwicklungen.
- [0023] Gegenstand der Erfindung sind somit vorzugsweise ummantelte Mikroorganismen als Träger für Nukleotidsequenzen zur Behandlung von proliferativen Erkrankungen, wobei in die Mikroorganismen folgende Komponenten eingefügt worden sind: I) mindestens eine Nukleotidsequenz, kodierend für mindestens ein direkt oder indirekt antiproliferativ oder zytotoxisch wirkendes Expressionsprodukt, II) mindestens eine Nukleotidsequenz, welche für mindestens ein Blutplasmaprotein unter der Kontrolle mindestens einer, im Mikroorganismus aktivierbaren Aktivierungssequenz kodiert, III) wahlweise mindestens eine Nukleotidsequenz, welche für mindestens einen zellspezifischen Liganden unter der Kontrolle mindestens einer, im Mikroorganismus aktivierbaren Aktivierungssequenz kodiert, IV) mindestens eine Nukleotidsequenz für mindestens ein Transportsystem, welches die Expression der Expressionsprodukte der Komponenten I), II) und III) auf der Außenfläche des Mikroorganismus oder die Sekretion der Komponenten I), II) und III) ermöglicht, V) wahlweise mindestens eine Nukleotidsequenz für mindestens ein Protein zur Lyse des Mikroorganismus im Cytosol von Säugerzellen und zur intrazellulären Freisetzung von Plasmiden enthalten in dem lysierten Mikroorganismus VI) mindestens eine in dem Mikroorganismus aktivierbare oder mindestens eine gewebezellspezifische, tumorzellspezifische oder nicht zellspezifische Aktivierungssequenz zur Expression von Komponente I):

## Bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung

## Komponente I

- [0024] Komponente I) ist mindestens eine Nukleotidsequenz, kodierend für mindestens ein direkt oder indirekt antiproliferativ oder zytotoxisch wirkendes Expressionsprodukt. Direkt antiproliferativ wirkende Expressionsprodukte im Sinne der Erfindung sind beispielsweise Interferone wie beispielsweise IFN-alpha, IFN-gamma, IFN-beta, Interleukine, welche Immunzellen oder Tumorzellen hemmen, wie beispielsweise IL-10, IL-12, proapoptotische Peptide oder Proteine wie beispielsweise TNF-alpha, FAS-Ligand, TNF-related apoptosis inducing Ligand (TRAIL), Antikörper oder Fragmente von Antikörpern, welche hemmend auf oder zytotoxisch für eine Immunzelle, eine Tumorzelle, oder eine Zelle des Gewebes, von welcher der Tumor stammt, wirken, wie beispielsweise Antikörper gerichtet gegen i) ein tumorassoziiertes oder tumorspezifisches Antigen, ii) ein Antigen auf Lymphozyten, wie beispielsweise gegen den T-Zellrezeptor, den B-Zellrezeptor, den Rezeptor für den CD40 Liganden, das B7.1 oder B7.2, den Rezeptor für ein Interleukin, wie beispielsweise IL-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10, -11, -12, -13, -14, -15 oder -16, den Rezeptoren für ein Interferon oder den Rezeptor für ein Chemokin, beispielsweise für RANTES, MCAF, MIP-alpha, MIP-beta, IL-8, MGSA/Gro, NPA-2 oder IP-10, iii) ein gewebespezifisches Antigen, wie beispielsweise gegen ein gewebespezifisches Antigen der Zellen von Brustdrüsen, Nieren, Muttermalen, Prostata, Schilddrüsen, Magenschleimhaut, Ovarien, Cervix, Blasenschleimhaut, ein antiproliferativ wirkendes Protein, wie beispielsweise das Retinblastomprotein (pRb = p110) oder die verwandten p107 und p130 Proteine oder antiproliferativ wirkende Mutanten diese Proteine, das p53 Protein und analoge Proteine oder antiproliferativ wirkende Mutanten dieser Proteine, das p21 (WAF-1) Protein, das p27 Protein, das p16 Protein, das GAAD45 Protein, antiproliferativ wirkende Proteine der Bcl2 Familie wie beispielsweise bad oder bak, zytotoxische Proteine wie beispielsweise Perform, Granzym, Oncostatin, eine antisense RNA oder ein Ribozym, spezifisch für eine mRNA, welche beteiligt ist an dem Wachstum oder der Proliferation einer Zelle, beispielsweise spezifisch für die mRNA, kodierend für einen Rezeptor, für ein signalübertragendes Enzym, für ein Protein, welches am Zellzyklus beteiligt ist, für einen Transkriptionsfaktor oder für ein Transportprotein. Indirekt antiproliferativ wirkende Proteine sind beispielsweise Induktoren von akuten Entzündungen und Immunreaktionen, wie beispielsweise Chemokine wie RANTES (MCP-2), Monocyte chemotactic and activating factor (MCAF), IL-8, Macrophage inflammatory protein-1 (MIP-1-alpha, -beta), Neutrophil activating Protein-2 (NAP-2), Interleukine wie IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, Human Leukemia inhibitory factor (LIF), IL-6, IL-7, IL-9, IL-11, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, Cytokine wie GM-CSF, G-CSF, M-CSF, Enzyme zur Aktivierung oder Spaltung der inaktiven Vorstufe einer zytotoxischen Substanz in eine zytotoxische Substanz, wobei

diese Enzyme eine Oxydoreduktase, eine Transferase, eine Hydrolase oder eine Lyase sind. Beispiele für derartige Enzyme sind  $\beta$ -Glucuronidase,  $\beta$ -Galactosidase, Glucose oxidase, Glycosidase, Alkohol Dehydrogenase, Laktoperoxydase, Urokinase, Tissue Plasminogen-aktivator/Carboxy Peptidase, Cytosin-Deaminase, Deoxycytidin Kinase, Thymidin Kinase, Lipase, Saure Phosphatase, Alkalische Phosphatase, Kinase, Purinnucleosidphosphorylase, Glucose Oxydase, Laktoperoxydase, Lactatoxydase, Penicillin-V-Amidase, Penicillin-G-Amidase, Lysozym,  $\beta$ -Lactamase, Aminopeptidase, Carboxypeptidase A, B oder G2, Nitroreduktase, Cytochrom p450 Oxydase. Gemäß der Erfindung kann das Enzym von einem Virus, einem Bakterium, einer Hefe, einem Weichtier, einem Insekt oder einem Säuger stammen. Bevorzugt werden solche Enzyme verwendet, welche vom Menschen stammen. Bevorzugt im Sinne der Erfindung werden des weiteren Nukleinsäurekonstrukte, welche für ein Fusionsprodukt eines zellspezifischen Liganden mit einem Enzym kodieren und/oder Proteine, welche die Angiogenese inhibieren, beispielsweise Plasminogenaktivatorinhibitor-1 (PAI-1); PAI-2 oder PAI-3, Angiostatin oder Endostatin, Interferon -alpha, - $\beta$ , oder -gamma, Interleukin 12, Plättchenfaktor 4, Thrombospondin-1 oder -2, TGF- $\beta$ , TNF-alpha, Vascular endothelial cell growth inhibitor (VEGI). Im Sinne der Erfindung kann die Komponente D) eine oder mehrere Nukleotidsequenzen darstellen kodierend für ein oder mehrere gleich oder unterschiedliche, direkt oder indirekt antiproliferativ oder zytotoxisch wirkende Proteine. Bevorzugt werden Kombinationen von Proteinen, welche eine additive oder synergistische Wirkung aufweisen. Additive oder synergistische Wirkungen sind beispielsweise bei folgenden Kombinationen ungleich wirkender Proteine zu erwarten: zytotoxische Proteine und proapoptotische Proteine, Enzyme und zytotoxische und/oder proapoptotische Proteine, antiangiogenetische Proteine und zytotoxische und/oder proapoptotische Proteine, Induktoren von Entzündungen und Enzyme oder zytotoxische, proapoptotische und/oder antiangiogenetische Proteine.

#### Komponente II

[0025] Komponente II) ist eine Nukleotidsequenz, welche für mindestens ein Blutplasmaprotein unter der Kontrolle einer im Mikroorganismus aktivierbaren Aktivierungssequenz kodiert. Bevorzugt werden humane Blutplasmae, und zwar solche, welche eine mittlere Blutverweilzeit von mehr als 24 Stunden aufweisen. Hierzu gehören im Besonderen beispielsweise Albumin (Nukleotide 1-2258, Hinchliffe et al. EP 0248637-A, 9.12.1987), Transferrin (Nukleotide 1-2346, Uzan et al. Biochem Biophys Res Commun 119: 273-281 (1984); Yang et al. PNAS-USA, 81: 2752-2756 (1984), Caeruloplasmin (Baranov et al. Chromosoma 96: 60-66, (1987), Haptoglobin (Nukleotide 1-1412, Rauei et al. Nucleic Acids Res 11: 5811-5819, (1983); Yang et al. PNAS-USA 80: 5875-5879, (1983); Brune et al. Nucleic Acids Res 12: 4531-4538 (1984), Haemoglobin alpha (Nukleotide 1-576; Marotta et al. PNAS-USA 71: 2300-2304 (1974) Chang et al. PNAS-USA 74: 5145-5149 (1977), Haemoglobin  $\beta$  (Nukleotide 1-626; Marotta et al. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 19: 165-175 (1976); Marotta et al. J Biol Chem 252: 5019-5031 (1977), alpha2 Macroglobulin (Nukleotide 1-4599; WO 9103557-A, 21.03.1991). Hierzu gehören jedoch auch andere Blutplasmae, wie beispielsweise Alpha1 Lipoprotein, Alpha2 Lipoprotein,  $\beta$ 1 Lipoprotein. Die Expression mindestens eines dieser Plasmae durch den erfindungsgemäßen Mikroorganismus bewirkt, dass der Mikroorganismus nach systemischer Verabreichung, - besonders nach Injektion in das Blutkreislaufsystem - im geringeren Maße von phagozytierenden Zellen aufgenommen wird, dadurch länger im Blut verweilen und sich im Tumorgefäßsystem oder in den Gefäßen einer chronischen Entzündung anreichern kann.

#### Komponente III

[0026] Komponente III) ist eine Nukleotidsequenz, welche für einen zellspezifischen Liganden unter der Kontrolle einer im Mikroorganismus aktivierbaren Aktivierungssequenz kodiert. Die Spezifität dieses Liganden ist abhängig von der Art der proliferativen Erkrankung, für welche der Mikroorganismus verwendet wird und den Zellen oder dem Gewebe, mit welchem die Komponente I) im Mikroorganismus in Kontakt gebracht werden soll, um die therapeutische Wirksamkeit zu erzielen. So werden beispielsweise verwendet bei Tumorerkrankungen Liganden mit Spezifität für Tumorzellen, d. h. für tumorassoziierte oder tumorspezifische Antigene oder Tumorendothelzellen oder für Gewebezellen, von denen der jeweilige Tumor stammt, beispielsweise für Zellen der Schilddrüse, der Prostata, des Ovars, der Brustdrüse, der Niere, der Magenschleimhaut, der Muttermale, der Cervix, der Harnblase; bei chronischen Entzündungen, zellulären Autoimmunerkrankungen und Abstoßungen von transplantierten Organen Liganden entweder mit Spezifität für Makrophagen, Dendritische Zellen, T-Lymphozyten oder für aktivierte Endothelzellen. Derartige Liganden sind beispielsweise spezifische Antikörper, oder Antigen-bindende Fragmente dieser Antikörper, Wachstumsfaktoren, Interleukine, Cytokine oder Zelladhäsionsmoleküle die an Tumorzellen, an Leukämiezellen, an Tumorendothelzellen, an Gewebezellen, an Makrophagen, Dendritischen Zellen, T-Lymphozyten oder an aktivierte Endothelzellen selektiv binden.

#### Komponente IV

[0027] Komponente IV) ist eine Nukleotidsequenz, kodierend für ein Transportsystem, welches die Expression der Expressionsprodukte der Komponenten I), II) und/oder III) auf die Außenfläche des Mikroorganismus ermöglicht. Die jeweilige Komponente kann hierbei wahlweise entweder sekretiert werden oder auf der Membran des Mikroorganismus, d. h. membranständig exprimiert werden. Komponenten II) und III) werden vorzugsweise membranständig exprimiert. Derartige Transportsysteme sind beispielsweise das Hämolysintransportsignal von E. coli (Nukleotidsequenzen enthaltend HlyA, HlyB und HlyD unter Kontrolle des hly-spezifischen Promoters, Gentschev et al. Gene, 179: 133-140, 1996). Folgende Transportsignale sind verwendbar: für die Sekretion das C-terminale HlyA-Transportsignal, in Gegenwart von HlyB und HlyD Proteinen; für die membranständige Expression das C-terminale HlyA-Transportsignal, in Gegenwart vom HlyB-Protein; das Hämolysintransportsignal von E. coli (Nukleotidsequenzen enthaltend HlyA, HlyB und HlyD unter der Kontrolle eines nicht hly-spezifischen bakteriellen Promoters); das Transportsignal für das S-layer Protein (Rsa A) von Caulobacter crescentus; für die Sekretion und für die membranständige Expression das C-terminale RsaA-Trans-

portsignal (Umelo-Njaka et al Vaccine, 19: 1406–1415, 2001); das Transportsignal für das TolC-Protein von *Escherichia coli* (das TolC-Protein wurde von Koronakis et al. (Nature, 405: 914–919, 2000) und von Gentschev et al (Trends in Microbiology, 10: 39–45, 2002) beschrieben); für die membranständige Expression das N-terminale Transportsignal.

5

## Komponente V

[0028] Komponente V) ist eine Nukleotidsequenz, kodierend für mindestens ein lytisches Protein, welches im Cytosol einer Säugerzelle exprimiert wird und den Mikroorganismus lysiert zur Freisetzung der Plasmide im Cytosol der Wirtszelle. Derartige lytische Proteine (Endolysine) sind beispielsweise Listerien-spezifische Lysis-Proteine wie z. B. PLY551 (Loessner et al Mol Microbiol 16: 1231–41, 1995), das Listeria-spezifische Holm unter der Kontrolle eines listeriellen Promoters. Eine bevorzugte Ausführungsform dieser Erfindung ist die Kombination unterschiedlicher Komponenten V), beispielsweise die Kombination eines Lysis-Proteins mit einem Holm.

15

## Komponente VI

[0029] Komponente VI) stellt eine beliebige Aktivatorsequenz dar, welche die Expression der Komponente I) kontrolliert. Für die Expression der Komponente I) auf der Außenfläche des Mikroorganismus ist die Komponente VI) eine der dem Fachmann bekannten, im Bakterium aktivierbaren Aktivierungssequenzen. Derartige Aktivierungssequenzen sind beispielsweise konstitutiv aktive Promotorregionen, wie die Promotorregion mit "Ribosomal binding site" (RBS) des beta-lactamase Gens von *E. coli* oder des tetA gens (Busby and Ebright, Cell 79: 743–746., 1994), induzierbare Promotoren, bevorzugt Promotoren, die nach Aufnahme in die Zelle aktiv werden. Zu letzteren gehört der actA Promoter von *L. monocytogenes* (Dietrich et al., Nat. Biotechnol. 16: 181–185, 1998) oder der pagC Promoter von *S. monocytogenes* (Bumann, Infect Immun 69: 7493–7500., 2001). Bevorzugt werden Aktivatorsequenzen, welche nach Freisetzung der Plasmide des bakteriellen Trägers im Zytosol der Zielzelle in dieser Zelle aktiviert werden. Beispielsweise kann der CMV-Enhancer, der CMV-Promoter, der SV40 Promoter oder jede andere, dem Fachmann bekannte Promoter- oder Enhancer-Sequenz verwendet werden. Bevorzugt werden weiterhin zellspezifische oder funktionsspezifische Aktivatorsequenzen. Die Wahl der zellspezifischen oder funktionsspezifischen Aktivatorsequenz ist abhängig von der Zelle oder dem Gewebe, in welchem der bakterielle Träger bzw die vom bakteriellen Träger freigesetzten Plasmide Komponente I) exprimieren sollen. Derartige Aktivatorsequenzen sind beispielsweise tumorzellassoziierte Aktivatorsequenzen (zu diesen gehören Aktivatorsequenzen der Gene für Midkine, GRP, TCF-4, MUC-1, TERT, MYC-MAX, surfactant Protein, alpha-Fetoprotein, CEA, Tyrosinase, Fibrillary acidic Protein, EGR-1, GFAP, E2F1, basisches Myelin, alpha-Lactalbumin, Osteocalcin, Thyroglobulin und PSA (McCormick Nature Reviews Cancer 1: 130–141, 2001)), endothelzellspezifische Aktivatorsequenzen (zu diesen gehören Aktivatorsequenzen der Gene für Proteine, welche von Endothelzellen bevorzugt exprimiert werden (Sedlacek, Critical Reviews in Oncology/Hematology 37: 169–215, 2001) wie beispielsweise VEGF, von Willebrand Faktor, Hirnspezifischer endothelialer Glucose-1-Transporter, Endoglin, VEGF-Rezeptoren, besonders VEGF-R1, VEGF-R2 und VEGF-R3, TIE-2, PDECGF-Rezeptoren, B61, Endothelin-1, Endothelin B, Mannose-6-Phosphat-rezeptoren, VCAM-1 und PECAM-1), Aktivatorsequenzen der Genen für Proteine, welche in solchen Gewebezellen bevorzugt exprimiert werden, von denen die Tumorzellen eines Patienten stammen (hierzu gehören Proteine exprimiert in Zellen des Brustgewebes (beispielsweise MUC-1, alpha-Lactalbumin), der Schilddrüse (beispielsweise Thyroglobulin), der Prostata (beispielsweise Kallikrein-2, Androgen-Rezeptoren, PSA), des Ovars, der Muttermale (beispielsweise Tyrosinase), und der Niere), Aktivatorsequenzen der Gene für Proteine, welche in Makrophagen, Dendritischen Zellen oder Lymphozyten exprimiert werden wie beispielsweise Interleukine, Cytokine, Chemokine, Adhäsions-moleküle, Interferone, Rezeptoren für Interleukine, Cytokine, Chemokine, oder Interferone, Aktivatorsequenzen, welche bei Hypoxie aktiviert werden, wie beispielsweise die Aktivatorsequenz für VEGF oder für Erythropoietin.

[0030] Die Einfügung der Komponenten I) bis VI) in die Mikroorganismen erfolgt mit den dem Fachmann bekannten molekularbiologischen Methoden. Beispielsweise ist bei Verwendung von Bakterien als Träger dem Fachmann geläufig, wie die Komponenten in geeignete Plasmide eingefügt und diese Plasmide in die Bakterien eingeführt werden.

[0031] Gemäß dieser Erfindung werden diese Mikroorganismen einem Patienten verabreicht zur Prophylaxe oder Therapie einer proliferativen Erkrankung wie beispielsweise eines Tumors, einer Leukämie, einer chronischen Entzündung, einer Autoimmunerkrankung oder der Abstoßung eines Organtransplantates. Zur Behandlung einer derartigen Erkrankung werden die erfindungsgemäßen Mikroorganismen in einer geeigneten Zubereitung lokal oder systemisch, beispielsweise in den Blutkreislauf, in eine Körperhöhle, in ein Organ, in ein Gelenk oder in das Bindegewebe verabreicht. Um bei systemischer Verabreichung, im Besonderen bei Verabreichung in den Blutkreislauf die unerwünschte Aufnahme der Mikroorganismen durch das sogenannte retikuloendotheliale System über die Wirkung der Komponente II) hinaus zu vermindern und die Blutverweilzeit der Mikroorganismen zu verlängern, können die Mikroorganismen in einer Lösung von Substanzen suspendiert werden, welche eine lange Blutverweilzeit besitzen. Der Suspension schließt sich eine Inkubation an. Die Suspension und Inkubation der Mikroorganismen kann beispielsweise in Blutplasma oder Blutserum erfolgen. Die Suspension und Inkubation wird jedoch vorzugsweise in Lösungen von Substanzen oder Lösungen von Gemischen von Substanzen durchgeführt, welche eine lange Blutverweilzeit aufweisen. Zu diesen Substanzen gehören beispielsweise Albumin, Transferrin, Präalbumin, Hämoglobin, Haptoglobin, Alpha-1-Lipoprotein, Alpha-2-Lipoprotein, beta-1-Lipoprotein, alpha-2-Macroglobulin, Polyethylenglykol (PEG), Konjugate von PEG mit natürlichen oder synthetischen Polymeren, wie beispielsweise mit Polyethylenimine, Dextrane, Polygeline, Hydroxyethylstärke.

[0032] Durch die Suspension und Inkubation in einer derartigen Lösung erfolgt eine Adsorption der Substanzen an die Oberfläche der erfindungsgemäßen Mikroorganismen. Eine Beschichtung der Mikroorganismen mit diesen Substanzen kann jedoch auch erfolgen durch Konjugation. Die Methoden der Konjugation sind in Sedlacek et al Contributions to Oncology 32: 1–132, 1988 übersichtlich zusammengefasst.

[0033] Die Beschichtung durch Adsorption erfolgt beispielsweise durch Suspension der Mikroorganismen in eine Lösung enthaltend vorzugsweise 0,1 bis 50% der Beschichtungssubstanzen über einen Zeitraum von vorzugsweise 10 Mi-

nuten bis 24 Stunden und einer Temperatur von vorzugsweise 4 Grad Celsius.

[0034] Gemäß der Erfindung werden als Mikroorganismen bevorzugt Bakterien verwendet, deren Virulenz vermindert wurde. Weiterhin bevorzugt werden Bakterien ausgewählt aus einer Gruppe, umfassend *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella*.

[0035] Mikroorganismen im Rahmen der Erfindung sind des weiteren Membranhüllen, sogenannte Geister, von lebenden bzw. existierenden Mikroorganismen. Derartige Membranhüllen werden beispielsweise gemäß der EP-A 0540525 hergestellt.

[0036] Gegenstand der Erfindung sind Arzneimittelzubereitungen, enthaltend die erfindungsgemäßen Mikroorganismen und die Verwendung dieser Arzneimittelzubereitung zur Prophylaxe und/oder Therapie einer proliferativen Erkrankung. Eine proliferative Erkrankung im Sinne dieser Erfindung ist eine Erkrankung mit überschießender oder unkontrollierbarer Zellproliferation, beispielsweise ein Tumorerkrankung wie ein Karzinom oder ein Sarkom, eine Leukämie, eine chronische Entzündung, eine Autoimmunerkrankung oder die Abstoßung eines Organtransplantates. Zur Prophylaxe oder Therapie einer Erkrankung werden die erfindungsgemäßen Mikroorganismen in der Arzneimittelzubereitung in einer Dosis von vorzugsweise 100 Keimen bis 100 Mio. Keimen einem Patienten lokal oder systemisch verabreicht.

[0037] Der Begriff ummantelt meint, daß auf der Außenseite der Membran des Mikroorganismus eine Mehrzahl gleicher oder verschiedener Moleküle (exprimiert und/oder sekretiert gemäß einem oder mehreren der Merkmale I) bis III)), wie vorstehend beschrieben, angebracht sein können, wobei der geometrische Bedeckungsgrad zwischen 0,001 und 1, insbesondere zwischen 0,01 und 1, beispielsweise zwischen 0,1 und 1 liegen kann. Der geometrische Bedeckungsgrad kann berechnet werden aus dem Quotienten der Gesamtfläche aller Moleküle, in radialer (bezogen auf einen Mittelpunkt des Mikroorganismus) Projektion in die Oberfläche des Mikroorganismus, und der Oberfläche des Mikroorganismus. In der Regel wird vereinfachend eine kugelförmige Oberfläche des Mikroorganismus angenommen und berechnet werden aus dem Volumen des Mikroorganismus. Das Merkmal "ummantelt" ist ggf. fakultativ.

#### Ausführungsbeispiele

##### Beispiel 1

Konstruktion eines Bakterienstammes zur membranständigen Expression von Humanem Albumin und Beta-Glucuronidase

[0038] In diesem Beispiel soll der Weg zum Bakterienstamm St21-bglu beschrieben werden. Dieser attenuierte *Salmonella typhi* Ty21a Stamm (Träger zum humanen Gebrauch zugelassen) exprimiert mit Hilfe der Hly Sekretionsmaschinerie von *E. coli* membranständige Fusionsproteinen von humaner Beta-Glucuronidase und HlyA sowie humanem Albumin und HlyA. Die Konstruktion basiert auf den bereits veröffentlichten Plasmiden pMOhly1 (Gentschev et al., *Behring Inst Mitt* 57-66, 1994) und pGP704 (Miller and Mekalanos, *J Bacteriol* 170: 2575-2583, 1988). Der Stamm ermöglicht durch passives Targeting (Bermudes et al., *Adv Exp Med Biol* 465: 57-63, 2000) eine Anreicherung von Beta-Glucuronidase am Tumor und somit eine auf Tumorgewebe beschränkte Spaltung von durch Beta-Glucuronidase aktivierbaren Pro-Drugs.

[0039] Eine membranständige Expression kann in Salmonellen durch Fusion des Proteins an den C-terminus des HlyA Sekretionsproteins in Anwesenheit des HlyB Proteins, aber in Abwesenheit eines vollständig funktionellen HlyD Proteins erfolgen. Allerdings darf HlyD nicht vollständig fehlen, da sonst keine Verbindung zwischen der Sekretionsmaschinerie und dem TolC Protein der äußeren Membran zustande kommt (Spreng et al., *Mol. Microbiol.* 31: 1596-1598, 1999). In diesen Beispielen ist eine der möglichen Modifikationen des HlyD Proteins zur membranständigen Expression angegeben. Zuerst wird daher der Vektor pMOhly DD konstituiert, bei dem kein funktionelles HlyD Protein erzeugt wird. Hierfür wird aus dem Vektor pMOhly1 durch die Endonukleasen DraIII und ApaI ein Teil des hlyD Gens entfernt. Nach dem Restriktionsverdau werden die Enden durch 3'-5' Exonuklease verdaut und das 10923 bps große Fragment religiert. Anschließend wird in diesen Vektor das Beta-Glucuronidase Gen in-Frame zum hlyA Gen kloniert. Hierfür wird die cDNA von bglu (GenBank Accession (Gb): M15182) aus einer cDNA Bank mit folgenden Primern durch Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert:

bglu 5': ATGCATTGCAGGGCGGGATGCTGTACC

bglu 3': ATGCATAAGTAAACGGGCTGTTTTCCAAAC.

[0040] Die zur cDNA von beta-Glucuronidase komplementären Bereiche sind unterstrichen, die Information für die generierte NsiI Stelle ist in kursiv dargestellt (diese Darstellung wird auch im Folgenden beibehalten; die Oligonukleotidsequenzen sind hier, wie auch im folgenden 5'-3' dargestellt). Die Primer sind so gewählt, dass das Gen ohne die Signalsequenz amplifiziert wird. Das Produkt (1899 bps) wird mit einem geeigneten "PCR Cloning Kit" subkloniert, und dann wird über NsiI Verdau das ~1890 bps Fragment extrahiert. Anschließend wird das NsiI Fragment in den NsiI geschnittenen Vektor pMOhly DD kloniert. Dies ergibt den Vektor pMO DD bglu (Fig. 1). (Wird das NsiI Fragment in den NsiI geschnittenen Vektor pMOhly1 kloniert, so entsteht das Plasmid pMO bglu, das eine Sezernierung des Fusionsproteins ermöglicht). Im zweiten Teil wird der Integrationsvektor für die chromosomale Integration der Albumin-HlyA Fusion hergestellt. In einem ersten Schritt wird der Vektor pMOhly alb hergestellt. Dieser auf pMOhly1 basierende Vektor trägt eine Fusion der Albumin-cDNA mit dem HlyA Gen. Zur Klonierung wird die cDNA des Albumin-Gens (Gb: A06977) aus einer käuflichen cDNA Bank mit Hilfe von PCR und den folgenden NsiI generierenden Primern amplifiziert:

5' : ATGCATGGGTAACCTTTATTTCCCTTC

3' : ATGCATAGCCTAAGGCAGCTTGACTTG-

- 5 [0041] Das 1830 bps große Fragment wird subkloniert und anschließend mit NsiI geschnitten. Das 1824 bps Fragment wird nun in NsiI verdauten pHohly1 ligiert. Das fertige Plasmid pMOhly alb exprimiert somit HlyB, HlyD und ein Fusionsprotein aus Albumin und HlyA. Für Experimente zur Verweildauer kann das NsiI Fragment alternativ auch in den Vektor pMO DD eingesetzt werden, dieser Vektor trägt den Namen pMO DDalb. Im weiteren Verlauf wird eine Modifikation der bereits beschriebene Klonierungsstrategie zur Integration im Salmonellenchromosom verwendet (Miller and Mekalanos, J Bacteriol 170: 2575-2583, 1988). Dafür wurde zuerst das aroA Gen von Salmonella in den Vektor pUC18 kloniert (PCR mit folgenden Primern:

Primer 5' : ATGGAATCCCTGACGTTACAACCC,

- 15 Primer 3' : GGCAGGCGTACTCATTCGCGC

- [0042] "Blunt" Klonierung des 1281 bps Fragments in die HincII Schnittstelle von pUC18). Anschließend wurde durch HincII Verdau und anschließende Religierung ein 341 bps großes in aroA liegendes Fragment entfernt. Dieser Vektor wurde pUC18 aroA' benannt. Anschließend wird das alb-hlyA Fusionsgen zusammen mit der auf pMOhly liegenden Promotorsequenz in den Vektor pUC18aroA' kloniert. Dazu wird der Vektor pMOhly alb mit AacII und SmaI verdaut und anschließend mit einer 3'-5' Exonuklease behandelt. Das 3506 bps große Blunt Fragment wird extrahiert und in HincII verdauten pUC18aroA' ligiert. Dies ergibt den Vektor pUCaro-alb. Nun wird das von aroA flankierte alb-hlyA Fragment mit den ganzen Aktivatorsequenzen aus dem Vektor pUCaro-alb in den Vektor pGP704 kloniert. Dazu wird pUCaro-alb mit HindIII verdaut und anschließend mit 5'-3' Exonuklease behandelt (Blunt). Anschließend wird mit EcoRI verdaut und das 4497 bps Fragment wird in den EcoRI/EcoRV (Blunt) verdauten Vektor pGP704 (EcoRI/RV Fragment: 6387 bps) ligiert. Es ergibt sich der Integrationsvektor pGParo-alb (Fig. 2). Der Vektor wird in den E. coli Stamm SM10pir transformiert. Dieser Stamm ermöglicht dem Vektor zu replizieren, da er das für die Replikation benötigte p-Protein bildet. Der Vektor wird nun über Konjugation in den Akzeptorstamm Salmonella typhi Ty21a transferiert, der keine Replikation des Vektors erlaubt. Daher werden durch Tetracyclin-Selektion nur Bakterien selektioniert, den Vektor chromosomal integriert haben. Die Überprüfung der zytoplasmatischen Albuminproduktion erfolgt über WESTERN-Blot Analyse des Bakterienlysats. Dieser Stamm, St21-alb, exprimiert zwar die alb-hlyA Fusion, kann sie in dieser Form weder sezernieren noch membranständig exprimieren. Dazu muss für membranständige Expression zusätzlich ein Plasmid mit funktionellem HlyB (wie pMO DDbglu) oder funktionellem HlyB und HlyD (wie pHc bglu) vorhanden sein. [0043] In diesem Beispiel wird das Plasmid pHo DDbglu mit dem Stamm St21-alb verwendet. Dies ergibt den Stamm St21-alb pMO DDbglu, der mit Hilfe des Hly Sekretionssystems sowohl humanes Albumin, als auch humane beta-Glucuronidase membranständig exprimiert. Dieser Stamm kann dann zur Pro-Drug Konversion im Sinne des Patents eingesetzt werden.

#### Beispiel 2

- 40 Konstruktion eines mit Albumin-HlyA Fusion ummantelten Bakterienstammes, zur Lieferung der genetischen Information von humaner Beta-glucuronidase

- [0044] Der in diesem Beispiel aufgezeigte Bakterienstamm soll mit Hilfe des passiven Targetings für humane Beta-Glucuronidase kodierende DNA an Tumorzellen liefern, die dann in den Tumorzellen exprimiert werden sollen. Um einen besonders einfach handhabbaren Stamm zu erhalten, wird in diesem Beispiel zur Membranexpression von Albumin ein leicht modifizierter Stamm wie in Beispiel 1 verwendet. Dabei soll sowohl das für Albumin-HlyA kodierende Gen chromosomal integriert werden, als auch die Information für HlyB. Damit exprimiert dieser Stamm konstitutiv membranständiges Albumin.

- 50 [0045] Zu diesem Zweck wird der oben beschriebene Vektor pMOhly alb durch BsrBI und EcoRI verdaut und anschließend mit 5'-3' Exonuklease behandelt. Dieser Verdau produziert ein 5815 bps großes Fragment mit Blunt-Enden, das die komplette prokaryotische Aktivierungssequenz und die Gene hlyC, alb-hlyA und hlyB enthält, nicht aber hlyD. Dieses Fragment kann nun Blunt in die HincII Schnittstelle des oben beschriebenen Vektor pUC18aroA' eingefügt werden.

- [0046] Dabei ergibt sich der Vektor pUCaro-alb-B. Durch einen EcoRI-NruI Verdau kann das 6548 bps Fragment wieder in den EcoRI-EcoRV verdauten Vektor pGP704 eingefügt werden (Fig. 3). Die weitere Vorgehensweise (Replikation und Integration in S. typhi Ty21a) entspricht dann der oben dargestellten Strategie. Der resultierende Stamm St21-alb-B exprimiert konstitutiv membranständiges Albumin-HlyA Fusionsprotein. Wird ein HlyD kodierender Vektor transfiziert, so wird das Albumin-HlyA Fusionsprotein sezerniert. Das Plasmid für die Lieferung der Beta-Glucuronidase kodierenden DNA basiert auf dem kommerziellen Vektor pCMVbeta (Clontech). Für die Konstruktion muss zuerst eine Fusion des bglu Gens mit einem Sekretionssignal verwendet werden. In diesem Beispiel soll das Signalpeptid des tPA Precursor Moleküls verwendet werden. Dieses Signalpeptid erlaubt eine besonders effiziente Produktion und Sekretion von Fusionsproteinen. Zur Klonierung der Fusion wird in einem ersten Schritt die 5' UTR der tPA cDNA (Gb E02027) bis zum Ende des für das Signalpeptid kodierenden Bereichs mit folgenden Primern über PCR amplifiziert (Amplifikation mit "Blunt" generierender Polymerase):

- 65 5' : GCGGCCGCAGGGAAGGAGCAAGCCGTGAATTT

3' : AGCTTAGATCTGGCTCCTCTTCTGAATC



[0047] Das entstehende 166 bp Fragment wird in den HindIII verdauten, 5'-3' Exonuklease behandelten, kommerziellen Vektor pCDNA3 (Invitrogen) ligiert. Die Ligation erfolgt in der "Forward" Orientierung. Dadurch lässt sich der tPA Signalsequenz kodierende Bereich über einen NotI Verdau komplett aus dem entstandenen Plasmid pCDNAtp ausschneiden. Dieses 237 bps Fragment wird nun mit dem 3760 bps Fragment des Vektors pCMVbeta nach NotI Verdau (enthält Vektor-Backbone) ligiert. Das entstandene Plasmid pCMVtp (3972 bps) kann nun für Expression heterologer Fusionsproteine verwendet werden. Für die Generierung des Plasmids pCMV bglu wird das mit folgenden, SpeI generierenden Primern ein bps Fragment des bglu (Gb M15182) Gens (ohne Sequenz für Signalpeptid) aus einer geeigneten cDNA Bank amplifiziert:

5' : ACTAGTCAGGGCGGGATGCTGTACCCCCAG

3' : ACTAGTCTTGCTCAAGTAAACGGGCTGTTTTTC.

[0048] Nach SpeI Verdau wird das 1899 bps Fragment in den SpeI verdauten Vektor pCMVtp ligiert. Das entstandene Plasmid pCMVtp bglu kodiert nun für eine N-terminale Fusion des tPA Signalpeptids mit dem Bereich des maturen Proteins von Beta-Glucuronidase. Nach der Bestimmung der richtigen Lage wird das Plasmid pCMVtp bglu (Fig. 4) in den Stamm St21-alb-B transformiert. Dieser Stamm erlaubt nun eine Lieferung der DNA an das Tumorgewebe mit Hilfe von passivem Targeting und die Expression der DNA durch transfizierte Tumorzellen erlaubt dann eine Konversion von geeigneten Pro-Drugs.

### Beispiel 3

Konstruktion eines mit Albumin-TolC Fusion ummantelten Stamm mit membranständiger Expression der extrazellulären Domäne von FAS und Lieferung eines ProDrug konvertierenden Enzyms

[0049] Der in diesem Beispiel gezeigte Stamm vereinigt die in Beispiel 2 gezeigten Eigenschaften mit einem gezielten Targeting an (Tumor-)Zellen, die Fas-Ligand (FasL) exprimieren. Mit diesem Stamm ist es möglich, gezielt FasL exprimierende Tumorzellen, wie beispielsweise in bestimmten Brusttumoren (Herrnring et al., Histochem Cell Biol 113: 189-194, 2000), anzugreifen. FasL Expression durch Tumorzellen wurde als potentieller Mechanismus zum Immunescape postuliert, da diese Zellen aktiv angreifende, Fas exprimierende, Lymphozyten eliminieren können (Muschens et al., J Mol Med 78: 312-325, 2000). Mit dem hier gezeigten Stamm lassen sich diese für eine Therapie sehr problematischen Tumorzellen gezielt angreifen und anschließend durch einen Apoptose-unabhängigen Mechanismus eliminieren. Der Trägerstamm basiert in diesem Beispiel auf eine Fusion von Albumin mit dem TolC Protein von E. coli. Dadurch wird eine membranständige Expression von Albumin erreicht. Die membranständige Expression der extrazellulären Domäne von Fas erfolgt über das Plasmid pMOhlyDD und zur Lieferung wird das oben beschriebene Plasmid pCMV-bglu verwendet. Der erste Schritt umfasst die Generierung des TolC-Albumin exprimierenden Trägerstamms. Dafür wird zuerst das Gen für das Fusionsprotein generiert, und anschließend wird dieses Gen, entsprechend den obigen Beispielen, über sukzessive Klonierung in pUCarA' und pGP704 in das Salmonellengenom integriert. Das TolC Gen für E. coli, mitsamt dem natürlichen Promotor, liegt in dem Plasmid pBRtolC vor. Dieses wurde mit Hilfe folgender SalI generierenden Primer aus dem Vektor pAX629 (enthält tolC Gen, Bereich im Vektor entspricht Gb X54049 Pos. 18-1914) amplifiziert:

5' tol: TAACGCCCTATGTCGACTAACGCCAACCTT,

3' tol: AGAGGATGTCGACTCGAAATTGAAGCGAGA.

[0050] Das 1701 bps Fragment wurde nach Spaltung mit SalI invers in die SalI Schnittstelle des Vektors pBR322 (Gb J01749) ligiert, wodurch das tet Gen unterbrochen wurde. Aufgrund der bekannten Kristallstruktur von TolC (Koronakis et al., Nature 405: 914-919., 2000) erlaubt das Einbringen heterologer DNA in die singuläre KpnI Schnittstelle im tolC Gen die Expression des kodierten heterologen Fusionsproteins in einer extrazellulären Schleife auf der Außenmembran. Zur Expression von Albumin wird das Albumin-Gen aus der cDNA (Gb A06977) mit Hilfe folgender KpnI generierenden Primer amplifiziert:

5' : GGTACCCGAGATGCACACAAGAGTGAGG

3' : GGTACCTAAGCCTAAGGCAGCTTGACTTGC.

[0051] Nach KpnI Verdau des 1770 bps Fragment kann die DNA in den KpnI geschnittenen Vektor pBRtolC eingesetzt werden. Die reverse Orientierung (in Frame zu tolC) ergibt dann den Vektor pBRtolC-alb. Das Gen für die tolC-Albumin Fusion kann nun über EcoRV und PshAI (Fragment 3970 bps) wird nun in umgekehrter Orientierung in die HincII Schnittstelle des Vektors pUCarA' ligiert. Der entstandene Vektor pUCarA-alb-tol (7596 bps) wird nun mit HindIII linearisiert, 5'-3' Exonuklease behandelt und anschließend mit EcoRI verdaut. Das 4961 bps Fragment wird dann in den EcoRI-EcoRV verdauten Vektor pGP704 eingesetzt (Fig. 5). Nach Konjugation (entsprechend Beispiel 1) ergibt sich der Stamm St21-tol-alb. Nun wird das Plasmid zur membranständigen Expression eines Fas (CD95)-HlyA Fusionsproteins mit Hilfe der HlyB Komponente der E. coli Typ I Sekretionsmaschinerie. Hierfür wird zuerst der für den extrazelluläre Bereich kodierende Abschnitt des Fas-Gens (Gb: M67454) mit folgenden NsiI generierenden Primern amplifiziert:

5' : ATGCATTATCGTCCAAAAGTGTTAATGC

3' : ATGCATTAGATCTGGATCCTTCCTCTTTGC.

5

[0052] Das 477 bps Fragment wird mit NsiI verdaut und in den NsiI verdauten Vektor pMOhly DD in Frame zum HlyA Gen eingesetzt. Der entstandene Vektor pMO DD-fas (Fig. 6) produziert somit nach Transformation in einen Salmonellenstamm ein membranständiges Fas-Fragment, dass bei geeigneter Faltung an FasL exprimierende Zellen binden kann. Somit können diese Salmonellen an FasL exprimierenden Zellen, wie beispielsweise Tumorzellen, angereichert werden.

10

[0053] Zum Abtöten der FasL Tumorzellen wird nun ebenfalls das Plasmid pCMV bglu (Beispiel 2) in die Salmonellen transfiziert. Damit ist dann, wie im obigen Beispiel, nach Expression der Beta-Glucuronidase durch Tumorzellen eine ProDrug-Drug vermittelte Tumorthherapie möglich. Die bessere Wirksamkeit dieses Beispiels im Vergleich zum vorigen Beispiel hängt ganz entscheidend von der korrekten Faltung der extrazellulären Domäne von Fas ab. Anstelle von Fas können auch FasL spezifische Fab-Fragmente monoklonaler Antikörper (die sich in Bakterien korrekt falten lassen) mit dem gleichen Ansatz wie hier beschrieben verwendet werden. Dieses Beispiel zeigt, dass mit Hilfe dieser Technik die Konstruktion von Stämmen mit nahezu beliebiger Zellspezifität über die Verwendung von geeigneten spezifischen Fab Fragmenten möglich ist.

15

#### Patentansprüche

20

1. Mikroorganismus, in dessen Genom folgende Komponenten eingefügt und exprimierbar sind:

25

I) eine Nukleotidsequenz, kodierend für ein direkt oder indirekt, antiproliferativ oder zytotoxisch wirkendes Expressionsprodukt oder für mehrere verschiedene solcher Expressionsprodukte,

30

II) eine Nukleotidsequenz, welche für ein Blutplasmaprotein unter der Kontrolle einer im Mikroorganismus aktivierbaren Aktivierungssequenz kodiert oder konstitutiv aktiv ist,

35

III) optional, eine Nukleotidsequenz, welche für einen zellspezifischen Liganden unter der Kontrolle einer im Mikroorganismus aktivierbaren Aktivierungssequenz kodiert oder konstitutiv aktiv ist,

40

IV) eine Nukleotidsequenz für ein Transportsystem, welches die Expression der Expressionsprodukte der Komponenten I) und II) sowie optional III) auf der Außenfläche des Mikroorganismus oder die Sekretion der Expressionsprodukte der Komponente I) und Expression der Komponente II) bewirkt und vorzugsweise konstitutiv aktiv ist,

45

V) optional eine Nukleotidsequenz für ein Protein zur Lyse des Mikroorganismus im Cytosol von Säugerzellen und zur intrazellulären Freisetzung von Plasmiden mit zumindest einer oder mehreren der Komponenten I) und VI) enthalten in dem lysierten Mikroorganismus, und

50

VI) eine in dem Mikroorganismus aktivierbare, und/oder eine gewebezellspezifische, tumorzellspezifische, funktionsspezifische oder nicht zellspezifische Aktivierungssequenz zur Expression von Komponente I),

55

wobei jede der Komponenten I) bis VI) einfach oder mehrfach, jeweils gleich oder verschieden, eingerichtet sein kann.

60

2. Mikroorganismus nach Anspruch 1, wobei der Mikroorganismus ein Virus, ein Bakterium oder ein einzelliger Parasit ist.

65

3. Mikroorganismus nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Virulenz des Mikroorganismus reduziert ist.

4. Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei der Mikroorganismus ein gram-positives oder gram-negatives Bakterium ist.

70

5. Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 1 bis 4 ausgewählt aus einer Gruppe bestehend aus "Escherichia coli, Salmonella, Yersinia enterocolitica, Vibrio cholerae, Listeria monocytogenes, und Shigella".

75

6. Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei der Mikroorganismus die Hülle eines Bakteriums ist.

80

7. Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 1 bis 6, bei welchem die Komponente I) kodiert für mindestens eine Protein, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus "Interferone; Interleukine; proapoptotische Proteine; Antikörper oder Antikörperfragmente, welcher hemmend auf oder zytotoxisch ist für eine Immunzelle, für eine Tumorzelle, oder für Zellen des Gewebes, von welchem der Tumor stammt; antiproliferativ wirkende Proteine; zytotoxische Proteine; Induktoren einer Entzündung, insbesondere Interleukine, Cytokine oder Chemokine; virale, bakterielle, von einer Hefe, von einem Weichtier, von einem Säuger oder vom Menschen stammende Enzyme zur Aktivierung oder Spaltung einer inaktiven Vorstufe eines Zytostatikums in das Zytostatikum; Fusionsprodukte aus einem zellspezifischen Liganden und einem Enzym; und Inhibitoren der Angiogenese".

85

8. Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die Komponente II) kodiert für mindestens ein Blutplasmaprotein ausgewählt aus einer Gruppe bestehend aus "Albumin, Transferrin, Haptoglobin, Haemoglobin, Alpha1 Lipoprotein, Alpha2 Lipoprotein, Beta1 Lipoprotein und alpha2 Macroglobulin".

90

9. Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die Komponente III) kodiert für mindestens einen Liganden spezifisch für einen Zielorganismus ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus "Tumorzellen; Tumorendothelzellen; Gewebezellen, von welchen ein Tumor stammt; aktivierte Endothelzellen; Makrophagen; dendritische Zellen; und Lymphozyten".

95

10. Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei die Komponente IV) kodiert für mindestens einen Liganden, spezifisch für eine Gewebezellenart aus Geweben, ausgewählt aus einer Gruppe bestehend aus "Schilddrüse, Brustdrüse, Speicheldrüse, Lymphdrüse, Brustdrüse, Magenschleimhaut, Niere, Ovar, Prostata, Cervix, Harnblasenschleimhaut, und Muttermal".

100

11. Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei die Komponente IV) kodiert für das Hämolystransportsignal von Escherichia coli, das S-Layer (Rsa A) Protein von Caulobacter crescentus, und/oder das TolC-Protein von Escherichia coli.

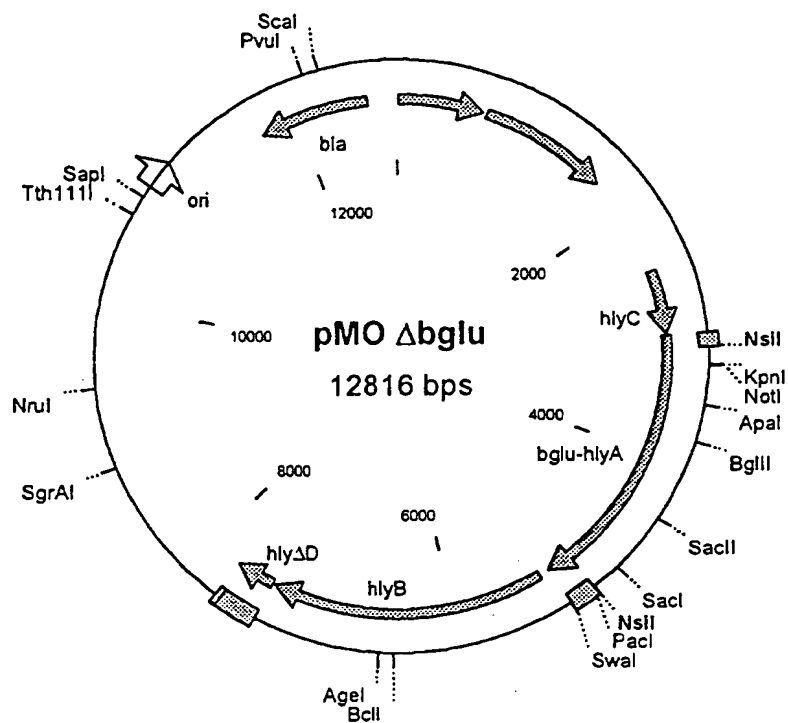
12. Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei die Komponente V) kodiert für ein lytisches Protein von gram-positiven Bakterien, für lytische Proteine von *Listeria monocytogenes*, für *PLY551* von *Listeria monocytogenes* und/oder für das Holm von *Listeria monocytogenes*.
13. Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 1 bis 12, an welchem eine Substanz gebunden ist, welche eine lange Blutverweilzeit aufweist, insbesondere mindestens eine Substanz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus "Albumin, Transferrin, Präalbumin, Hämoglobin, Haptoglobin, Alpha-1-Lipoprotein, Alpha-2-Lipoprotein,  $\beta$ -1-Lipoprotein, alpha-2-Macroglobulin, Polyethylenglykol (PEG), Konjugate von PEG mit natürlichen oder synthetischen Polymeren, wie beispielsweise mit Polyethylenimine, Dextrane, Polygeline, Hydroxyethylstärke und Mischungen dieser Stoffe", wobei die Bindung der Substanzen durch Physisorption, Chemisorption oder kovalent erfolgt.
14. Plasmid oder Expressionsvektor enthaltend die Komponenten I), II), IV) und VI), sowie, optional, eine oder mehrere der Komponenten III) und V).
15. Verfahren zur Herstellung eines Organismus nach einem der Ansprüche 1 bis 13, wobei ein Plasmid nach Anspruch 14 erzeugt wird und mit diesem Plasmid ein Mikroorganismus transformiert wird.
16. Verwendung eines Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Herstellung eines pharmazeutischen Zusammensetzung.
17. Verwendung eines Mikroorganismus zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung für die Prophylaxe und/oder Therapie einer Erkrankung, welche verursacht wird durch eine unkontrollierte Zellteilung, insbesondere einer Tumorerkrankung, beispielsweise eines Prostatakarzinoms, eines Ovarkarzinoms, eines Mammakarzinoms, eines Magenkarzinoms, eines Nierentumors, eines Schilddrüsentumors, eines Melanoms, eines Cervixtumors, eines Harnblasentumors, eines Speicheldrüsentumors und/oder eines Lymphdrüsentumors, einer Leukämie, einer Entzündung, einer Organabstoßung, und/oder einer Autoimmunerkrankung.
18. Verwendung nach Anspruch 17 für die Entfernung eines Tumors wie auch des gesunden Gewebes, von welchem der Tumor stammt.
19. Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 16 bis 18, wobei ein ummantelter Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 1 bis 13 in physiologisch wirksamer Dosis mit einem oder mehreren physiologisch verträglichen Trägerstoffen zur oralen, i. m., i. v., oder i. p Gabe hergerichtet wird.

---

Hierzu 6 Seite(n) Zeichnungen

---

- Leerseite -



**Fig. 1: Vektor pMO Dbglu**

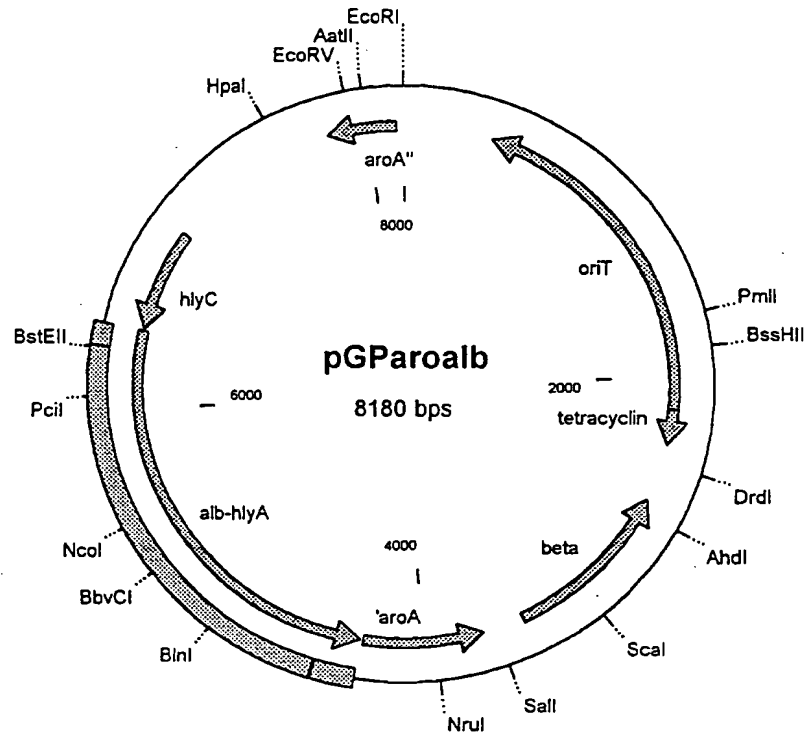


Fig. 2: Vektor pGParoalb

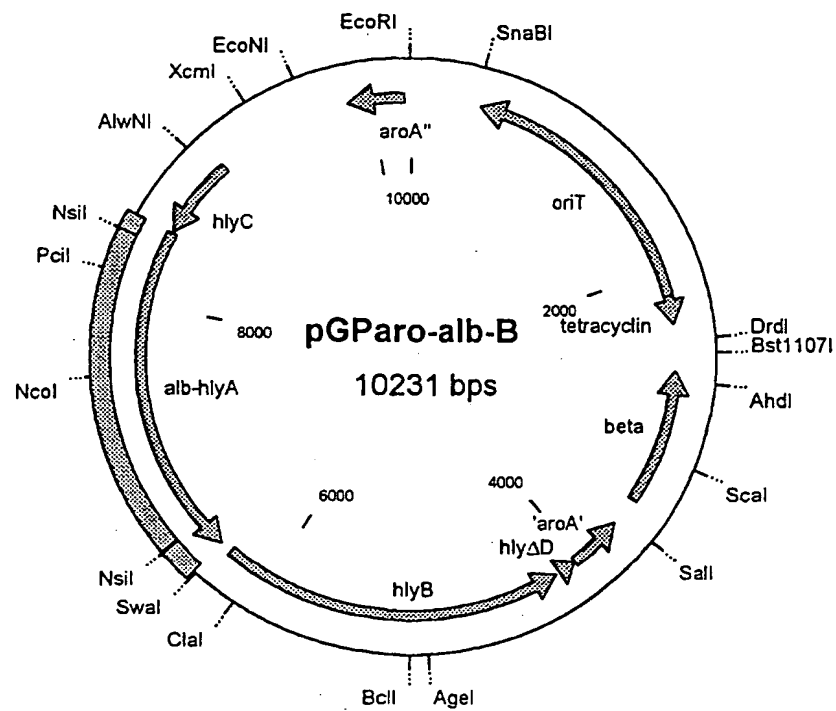


Fig. 3: pGParo-alb-B

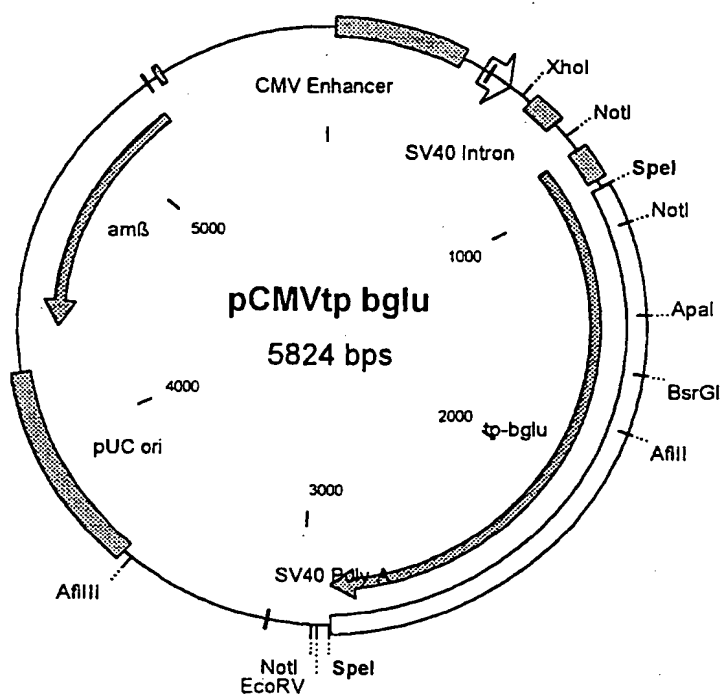


Fig. 4: pCMVtp bglu



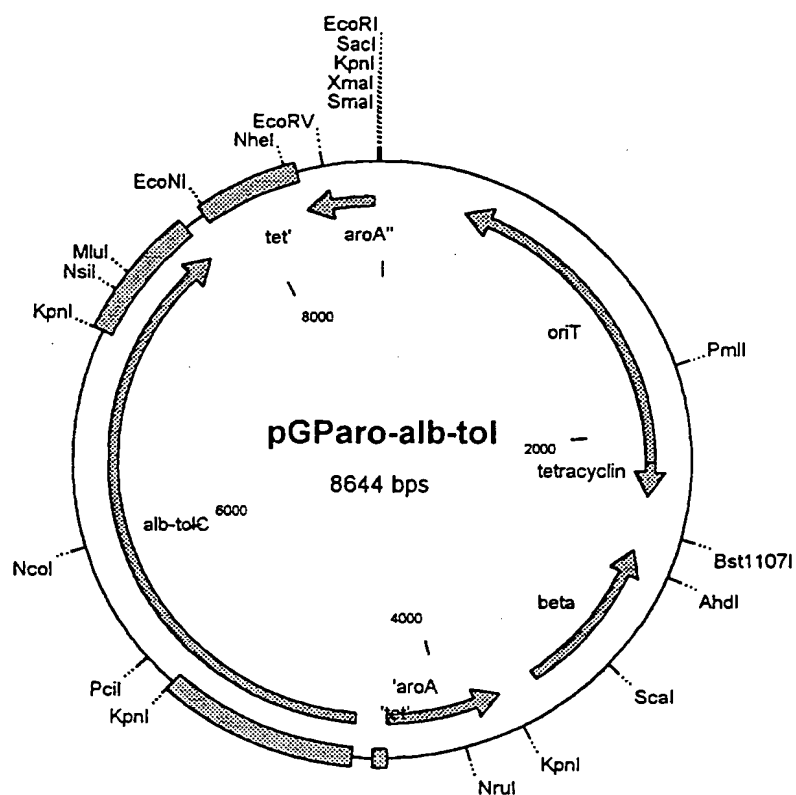


Abbildung 5: pGParo-alb-tol

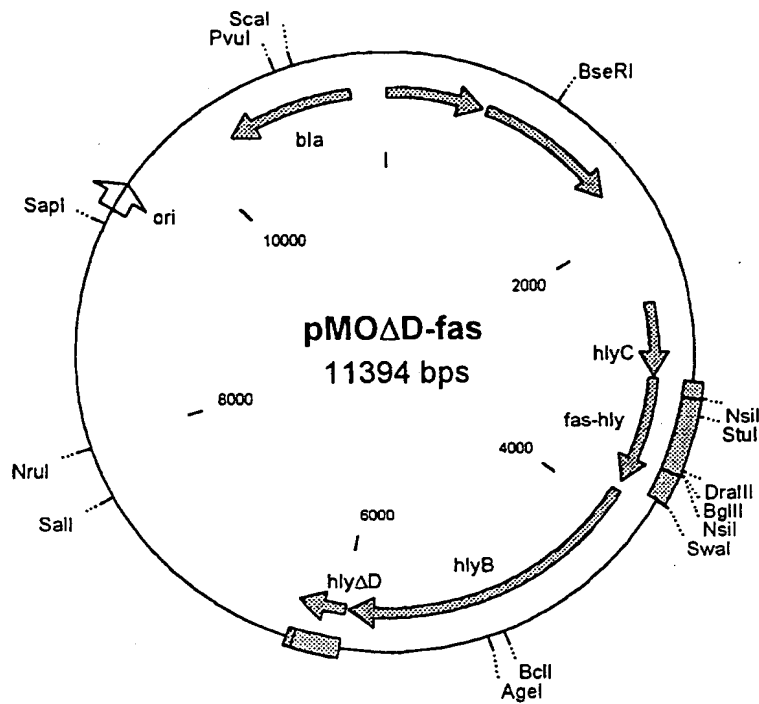


Abbildung 6: pMO DD-fas